



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(19)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

EP 0 875 271 A2

(11)



CK

(12) (43) Veröffentlichungstag: 04.11.1998 Patentblatt 1998/45  
(51) Int. Cl. B01D 39/00, C12M 1/12, C12N 1/08, C12N 15/10

(21) Anmeldenummer: 98107576.5

(22) Anmeldetag: 01.12.1992

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
BE CH DE DK FR GB IT LI LU NL SE

(30) Priorität: 02.12.1991 DE 4139664

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPU:  
92924637.9 / 0 616 639

(71) Anmelder: QIAGEN GmbH  
40724 Hilden (DE)

(72) Erfinder: Colpan, Melin, Dr.  
45219 Essen (DE)

(74) Vertreter:  
Meyers, Hans-Wilhelm, Dr. Dipl.-Chem. et al  
Patentanwälte  
von Kreisler-Selling-Werner  
Postfach 10 22 41  
50462 Köln (DE)  
Bemerkungen:  
Diese Anmeldung ist am 25. 04. 1998 als  
Teilanmeldung zu der unter INID-Kode 62  
erwähnten Anmeldung eingereicht worden.

(54) Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

(57) Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei die Nukleinsäuren enthaltenen Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt werden durch Filtration an einer Filterschicht.

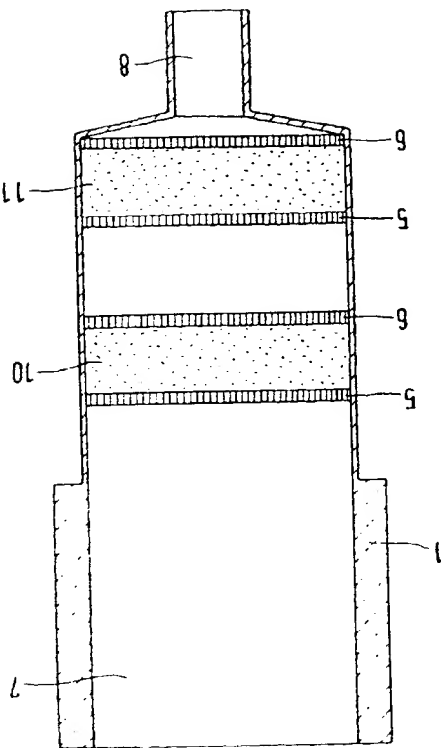


FIG. 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren wie Plasmid- oder genomischer DNA aus Zellen oder anderen Quellen und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß Oberbegriff des Patentanspruchs 16.

Bei der Präparation von Nukleinsäuren müssen die

Zellen zunächst durch die Verwendung von Enzymen, wie zum Beispiel Proteinase K, Lysozym und Detergen-  
 10 tien wie SDS, Brij, Triton-X-100, Tween 20, DOC und Chemikalien wie Natriumhydroxid, Guanidin-Hydro-  
 chlorid und Guanidin-Isocyanat aufgeschlüsselt werden. Dem Experimentator stellt sich das Problem,  
 vor der Reinigung der Nukleinsäuren die Zelltrümmer  
 15 zu entfernen und dann aus dem Zell-Lysat die Nuklein-  
 säuren oder Nukleinsäurefraktionen zu isolieren. Wei-  
 20 terhin müssen bei der Präparation von Plasmid DNA  
 oder genomischer DNA häufig verwendete Detergenti-  
 en, wie SDS (Sodium Dodecylsulfat), entfernt werden.  
 Dies erfolgt wie in den meisten Fällen bei Verwendung  
 von SDS durch ein Ausfällen mit Kaliumacetat, da das  
 Kaliumsalz von SDS schwer löslich ist. Die Zelltrümmer  
 werden dann zusammen mit dem ausgefallenen SDS  
 25 abzentrifugiert. Da die Bestandteile im Lysat ein sehr  
 voluminöses und schweres, gelartiges Pellet erge-  
 ben, bereitet selbst die Abtrennung dieser Trümmer in  
 einer hochtourigen Zentrifuge Schwierigkeiten. Übli-  
 30 cherweise erfolgt die Entfernung der Zelltrümmer durch  
 eine Zentrifugation zwischen 5 000 g bis 20 000 g für  
 15 bis 60 Minuten. Dieses Verfahren hat den Nachteil,  
 daß es sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist und sich nicht  
 35 automatisieren läßt.

Die DE-A 36 39 949 beschreibt ein Verfahren zur  
 Isolierung und Reinigung langkettiger Nukleinsäuren  
 von anderen Substanzen aus Bakterien, Viren, tieri-  
 40 schen und pflanzlichen Geweben und Zellen sowie Kör-  
 perflüssigkeiten, insbesondere Zellinhaltsstoffen und/  
 oder deren Abbauprodukten sowie Bestandteilen der  
 sind. Dabei werden die langkettigen Nukleinsäuren  
 nach einem schonenden Aufschluß und Entfernung der  
 Zellbruchstücke und anderer ungelöster Bestandteile  
 an einem Anionenaustauscher fixiert, während die ab-  
 45 zutrennenden Substanzen ausgewaschen werden. Da-  
 nach werden die fixierten Nukleinsäuren mit einem Put-  
 ter hoher Ionenstärke von der Matrix wieder abgelöst.

Aus der DE-A 37 17 211 ist ein Verfahren bekannt

zur Trennung und Reinigung von Biopolymeren, wie Nu-  
 kleinsäuren, wobei die Nukleinsäuren an einer in einer  
 speziellen Vorrichtung angeordneten Matrix adsorbiert  
 werden. Die Pufferbedingungen sind dabei so einge-  
 stellt, daß die Nukleinsäuren überwiegend adsorbiert  
 werden, während störende Substanzen, wie Proteine,  
 55 niedermolekulare Stoffe oder auch Zelltrümmer, nicht  
 gebunden werden.  
 In Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung  
 von Nukleinsäuren, eine Einführung und methodische

Chemie, 1980 werden Methoden zur Isolierung von Nu-  
 kleinsäuren, beschrieben. Daraus geht hervor, daß  
 hochmolekulare Ribonukleinsäuren in Salzlösungen >  
 1,5 M Natriumchlorid unlöslich sind und ausfallen. Diese  
 Präzipitation wird jedoch als nicht effizient angesehen,  
 so daß in dieser Monographie bereits mehrfache Wie-  
 10 derholungen der Präzipitationsschritte mit hoher Salz-  
 konzentration empfohlen werden.

Eine effiziente Trennung sowohl von DNA-Restrik-  
 15 tionstragfragmenten und amplifizierten Produkten der Poly-  
 merase-Kettenreaktion wird in J. Chromatogr., 1990,  
 512, 433 - 444 beschrieben. Als Chromatographiemate-  
 rial wird ein Ionenaustauscher DEAD-NPR-Material  
 mit 2,5 µm großen, nicht porösen Partikeln verwendet.  
 Nukleinsäure aus Hefen wurden gemäß Biochemi-  
 20 stry 1972, 4848 an Poly(L-Lysine)-beschichtetem Kie-  
 selgürtel getrennt. Ebenso wurde bereits mitochondriale  
 DNA an solchen chromatographischen Materialien ge-  
 trennt.

In Chromatographia, 1984, 19, 236 - 9 wird die Ver-  
 wendung von mehrdimensionaler Chromatographie zur  
 Isolierung von synthetischen Oligodeoxyribonukleoti-  
 25 den im präparativen Maßstab beschrieben. In einem er-  
 sten Schritt wird dabei zunächst eine Size-Exclusion-  
 Chromatographie an Sephadex G-15 durchgeführt, ge-  
 folgt von einer Size-Exclusion-Chromatographie mit ei-  
 ner HPLC-Ionenaustauschensäule (Partisil-10 SAX).  
 Daran schließt sich eine hydrophobe Chromatographie  
 30 mittels HPLC (Nucleosil C18) an.  
 Über die Eignung von hydrophob beschichteten  
 Glaspartikeln zur Durchführung von adsorptions-chro-  
 matographischer Reinigung von Nukleinsäuren wird in  
 J. Biochem., 94, 163 - 169 (1983) berichtet.

Nachteilig an diesem stielvertretenden Stand der  
 Technik ist die Tatsache, daß ein Zentrifugationsschritt  
 zur Entfernung der Zellbruchstücke und der ungelösten  
 Bestandteile aus dem Zell-Lysat notwendig ist. Ein wei-  
 40 teres Problem besteht darin, daß die Nukleinsäuren  
 durch die Elution in Puffern hoher Ionenstärke von den  
 in großer Konzentration vorhandenen Salzen befreit  
 und gleichzeitig konzentriert werden müssen. In den al-  
 lern meisten Fällen sind die weiteren Verfahrensschritte  
 45 mit den so gewonnenen Nukleinsäuren nur mit Put-  
 terbedingungen möglich, die geringere Ionenstärken  
 aufweisen. Die Entfernung der in hoher Konzentration  
 im Puffer gelösten Salze kann auch durch Dialyse erfol-  
 50 gen, jedoch führt dies zu merklicher Degradation der  
 Nukleinsäuren in den entsprechenden Puffern. Nach  
 der Dialyse muß die entsalzte Nukleinsäure durch eine  
 Gefrierockung konzentriert werden. Eine andere Art  
 der Konzentrierung erfolgt durch eine Fällung der Nu-  
 55 kleinsäure mit Ethanol, Isopropanol, Polyethylenglykol  
 (PEG). Die Nukleinsäuren sind in diesem System nicht  
 löslich und fallen aus. Die ausgefallenen Nukleinsäuren  
 müssen jedoch durch einen Zentrifugationsschritt pelle-  
 tiert werden. Das Nukleinsäurepellet wird kurz getrock-  
 net und anschließend in einem kleinen Volumepuffer

ionenaustauscher können poröse Trägermaterialien mit einer zur Wechselwirkung geeigneten inneren Oberfläche hoher Kapazität oder nicht poröse Trägermaterialien sein, die nur auf der äußeren Oberfläche eine Wechselwirkung mit dem zu trennenden Gemisch eingehen. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Anionenaustauscher um ein Material auf Basis von Silicagel, das eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, vorzugsweise 10 bis 50 µm und ganz besonders bevorzugt 15 bis 25 µm und einen Porendurchmesser von 1 bis 2 500 nm, bevorzugt 10 bis 500 nm, besonders bevorzugt 100 bis 400 nm, aufweist. Als Anionenaustauschermaterial hat sich insbesondere ein Material mit hoher Oberfläche und hoher Bindungskapazität für Nukleinsäuren erwiesen. Die Modifizierung des Silicagels erfolgt vorzugsweise durch Silanisierung des Trägermaterials, wie beispielsweise in der EP-A 83 901 065, DE-A-39 35 098 und US-A-5.057.426 offenbart. In der EP-A 83 901 065 wird zum Beispiel gamma-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und N,N-Dimethylaminooethanol zur Modifizierung des Trägermaterials verwendet.

Die Adsorption der Nukleinsäuren erfolgt unter Bedingungen, wie sie typischerweise bei niedrigen Salzkonzentrationen vorliegen. Vorzugsweise sind die niedrigeren Salzkonzentrationen als solche mit der die Nukleinsäuren von der Säule eluiert werden können. Je nach verwendeten Ionenaustauschermaterialien und pH-Werten kann die Salzkonzentration dabei 0,25 bis 1,5 M betragen.

Nach der Adsorption der Nukleinsäuren an dem Anionenaustauschermaterial kann sich mindestens ein Waschschritt mit Puffer geringer Ionenstärke anschließen.

Vorzugsweise befindet sich das Ionenaustauschermaterial bei der Elution in einem überwiegend zylindrischen Hohlkörper einer Säule. Die Säule wird dann mit einer Salzlösung gewaschen, deren Ionenstärke so hoch wie möglich ist, ohne daß die erwünschte Nukleinsäure eluiert wird. Damit werden niedermolekulare und schwach geladene Verunreinigungen und Proteine ausgetrennt.

Um unnötige Ausbeuteverluste zu vermeiden, kann es vorteilhaft sein, zwischen dem Adsorptionsschritt und dem Elutionsschritt oder als letzten Waschschritt eine Konditionierung der betreffenden Adsorptionsmaterialien durchzuführen, indem eine - möglichst hohe Ionenstärke insbesondere in dem Bereich, in dem die spätere Adsorption der Nukleinsäure unter Hochsalzbedingungen erfolgt sein soll, eingesetzt wird. Dazu kann insbesondere eine Lösung zur Aquilibrierung und Konditionierung verwendet werden, die einer Ionenstärke von etwa 1,5 M Natriumperechlorat bei einem pH von ungefähr 5 entspricht.

Entsprechend befindet sich das Material zur Bindung der Nukleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke in einem separaten überwiegend zylindrischen Hohlkörper. Die von dem Ionenaustauschermaterial desorbierte Nukleinsäurefraktion wird in der hoch

sehr niedriger Salzkonzentrationen gelöst, um eine konzentrierte salzfreie Nukleinsäureprobe zu erhalten. Durch diese Zentrifugations- und Fällungsverfahren ist eine einfache und schnelle Gewinnung von Nukleinsäuren nicht möglich und eine Automatisierung läßt sich nur schwer durchführen. Andererseits steigt der Bedarf nach einfachen und automatischen Verfahren zur Präparation von Nukleinsäuren durch das Vordringen der Molekularbiologie in die klinische Diagnostik sowie die Sequenzierung des menschlichen Genoms. Dabei sind jeweils große Probenmengen aufzuarbeiten.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das es ermöglicht, Nukleinsäuren zu isolieren und zu reinigen, ohne daß ein Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Zellbruchstücke oder ungelöster Bestandteile des Zell-Lysats notwendig wäre und, ohne daß die Nukleinsäuren in Puffersystemen hoher Salzkonzentrationen antallen, wobei die Nukleinsäuren einen nachgeschalteten Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt notwendig machen. Das bereitzustellende Verfahren soll die Nukleinsäuren praktisch in einem direkt weiterverarbeitbaren Zustand liefern. Ein weiterer Aspekt des genannten technischen Problems besteht in der Schaffung einer Vorrichtung, mit der das Verfahren in besonderer vorteilhafter Weise ausgeführt werden kann.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird in überraschend einfacher Weise durch ein Verfahren gelöst, daß durch die Merkmale des Anspruchs 1, 34, 36 charakterisiert ist. Die daran anschließenden Verfahrensansprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren.

Eine Vorrichtung, mit der das erfindungsgemäße Verfahren in besonders vorteilhafter Weise ausgeführt werden kann, ist durch die Merkmale des Anspruchs 16, 35, 37 charakterisiert. Die darauf zurückbezogenen Unteransprüche betreffen weitere bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Zunächst werden die Zellen, deren Nukleinsäure isoliert werden sollen, in üblicher Weise aufgeschlossen und die Zelltrümmer werden entfernt. Dies kann mittels Filtration oder Zentrifugation geschehen. Vorzugsweise erfolgt die Gewinnung der klaren Zell-Lysate durch eine Filtration über eine stützenweise oder asymmetrisch aufgebaute Filterschicht. Das die Nukleinsäuren enthaltende Filtrat kann sofort mit Anionenaustauschern behandelt werden. Als Anionenaustauscher kann ein handelsübliches Material ausgewählt werden, welches eine Bindung der zu isolierenden Nukleinsäure unter den jeweiligen Präparationsbedingungen erlaubt. Die Anionen-austauscher sind vorzugsweise oberflächenmodifizierten Träger aus einer Matrix, vorzugsweise bestehend aus Agarose, Dextran, Zellulose, Acrylamid, Polyvinylalkohol, Polystyrol, Glas, Aluminiumoxid, Titan dioxid, Zirkonoxid oder Silicagel, wie zum Beispiel DEAE-Sephadex, Q-Sepharose, DEAE-Sephadex, DEAE-Sephacel, Toyopearl, Amberlite Nukleogen, Qagen. Die An-

Zugabe von niederen Alkoholen in die Probe erfolgen. In Frage kommen vorzugsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol sowie Butanol. Die bevorzugten Mengenbereiche, in denen die Alkohole der Probe zugesetzt werden, betragen 1 - 50% (v/v), soweit sie überhaupt in diesen Bereichen in Wasser löslich sind. Des weiteren kann die Adsorption der Nukleinsäuren auch durch Polyethylenglykole erreicht werden. Die verwendeten Ethylenglykole weisen Molekulargewichte von 1.000 bis 100.000, insbesondere 6.000 bis 8.000, auf. Polyethylenglykol kann in Bereichen von 1 - 30% der Probe zugesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt überraschenderweise, daß Nukleinsäure auch beim Passieren von sehr dünnen Schichten von Glas oder Silicagel effizient adsorbieren, obwohl die Verweilzeit nur 1 - 30 Sekunden beträgt. Es zeigt sich auch, daß eine Bindung in hohen Natriumchlorid- und Lithiumchloridkonzentrationen erfolgt und chaotrope Salze nicht notwendig sind. Auch ist bisher eine Kombination aus Anionenaustauscher und Silicagel nicht beschrieben, wobei der Anionenaustauscher die Reinigung der Nukleinsäure übernimmt und bei den Konzentrationen von 0,25 M - 1,5 M Salz zwar die Verunreinigungen, wie Metaboliten, Proteine und teilweise RNA, Polysaccharide entfernt werden, aber diese unter den gegebenen Bedingungen nicht an die nachgeschaltete Silicagelschicht adsorbieren können, und die Silicagel-schicht die Entsalzungs- und Konzentrationsaufgabe übernimmt, wenn die Nukleinsäure im folgenden Schritt mit einer Salzkonzentration vom Anionenaustauscher eluiert wird, die hoch genug ist die Nukleinsäure an die Silicagelschicht adsorbieren kann.

Als Puffersalze in den angegebenen Konzentrationen kommen für den Adsorptionsschritt an den mineralischen Träger folgende in Betracht:

Salz	Konzentration
NaCl	3 - 5 M
NaClO <sub>4</sub>	5 - 7 M
Gu-HCl	5 - 7 M
NaI	3 - 5 M

Die Behandlung mit der Salzlösung kann einfach durch Auftröpfeln auf den Filter und Absaugen erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Silicagelschicht mit einer Perchloratlösung, pH 6,5 bis 8,5, insbesondere pH 7 bis 8, behandelt. Dies erfolgt zweckmäßig durch Pipettieren und Durchsaugen. Besonders bevorzugt wird hierzu eine Lösung, die 4 bis 8 M NaClO<sub>4</sub>, 5 bis 20 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8 und 0,5 bis 2 mM EDTA enthält, verwendet. Nach dem Entfernen der chaotropen Lösungen, insbesondere der Natriumperchloratlösung, wird vorzugsweise mit wäbrigem Ethanol nachgewaschen, zum Beispiel mit 50 bis 90%-igem Ethanol.

salzhaltigen Fraktion in die Kartusche oder die Säule mit dem Nukleinsäuren unter Hochsalzbedingungen absorbieren Material gegeben. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die jeweiligen Vorrichtungen mit den entsprechenden Adsorptionsmaterialien so aufeinander abgestimmt, daß der Behälter mit dem Anionenaustauscher auf dem Behälter mit dem Nukleinsäure unter hohen Ionenstärken bindenden Material angeordnet werden kann.

Eine Konditionierung des Materials, das die Nukleinsäuren bei hoher Ionenstärke adsorbieren kann, ist insbesondere bei dieser Vorgehensweise besonders leicht möglich. Die Konditionierung kann bereits dadurch erfolgen, daß das Material, das die Nukleinsäuren bei hoher Ionenstärke binden kann, mit entsprechend hochkonzentrierten Salzlösungen vorbehandelt wird. Es ist jedoch auch möglich, entsprechend vorbehandelte Materialien zu verwenden, indem beispielsweise das Nukleinsäure adsorbierende Material zunächst mit Salzlösungen hoher Ionenstärke behandelt wird und danach das Lösungsmittel verdampft wird, so daß sich in dem Nukleinsäuren unter hohen Ionenstärken absorbierenden Material sehr hohe Salzkonzentrationen unmittelbar einstellen, wenn eine wäßrige Lösung darin in Verbindung gebracht wird. Vorliegend ist die Konditionierung aufgrund der Tatsache, daß die ersten Volumeneinheiten, die sich durch die Elution der Nukleinsäuren vom Anionenaustauscher von diesem Material lösen noch eine möglicherweise zu geringe Salzkonzentration aufweisen, um hinreichend fest an dem folgenden Material zu adsorbieren. Trifft nun ein relativ verdünnter Elutionsstrom vom Anionenaustauscher auf ein so konditioniertes Material, das Nukleinsäure unter Bedingungen hoher Ionenstärke zu binden vermag, so stellt sich sofort eine hohe Salzkonzentration ein und die Nukleinsäuren werden an diesem Material adsorbiert.

Durch kann die Nukleinsäure mit einem Puffer hoher Ionenstärke von dem Anionenaustauschermaterial entfernt und dann unmittelbar im Elutionspuffer hoher Ionenstärke mit einem mineralischen Träger gebunden. Nukleinsäuren können in Gegenwart von Salzen wie Natriumchlorid, Natriumperchlorat oder Natriumiodid, Natriumperchlorat oder Natriumiodid gebunden werden. Wenn die Nukleinsäuren mit der feinen Glassuspension versetzt und längere Zeit in der Suspension verbleiben, so kann eine Bindung der Nukleinsäure an das Silicagel ermöglicht werden (B. Vogelstein und D. Gillespie, Nat. Acad. Sci. USA, 76, 615 - 19, Preparation and analytical purification of DNA from agarose; J. Lis und B. Wu, 1979, Elution of DNA from agarose; M. A. Marko, R. Chipperfield und H. C. Burton, 1982, A procedure for the large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder, Anal. Biochem. 121, 382 - 387).

Die Adsorption der Nukleinsäuren an die mineralischen Träger kann überraschenderweise auch durch

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die Isolierung und Präparation von Plasmid-DNA und genomischer DNA geeignet.

Die Figuren zeigen bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei die verschiedenen Adsorptionsmaterialien für die Nukleinsäuren in einer Vorrichtung vereint sind.

Die Figur 1 zeigt eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, die aus einem Hohlkörper 1 mit einer Einlaßöffnung 7 und einer Auslaßöffnung 8 besteht. Der Hohlkörper besteht vorzugsweise aus Polypropylen (PP), Polyethylen (PE), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyethylenerephthalat (PET) oder Polyacrylnitril (PAN). Im Hohlkörper 1 ist zwischen zwei Fixiereinrichtungen 5, 6 ein pulverförmiges erstes Material aus einem mineralischen Trägermaterial 10 angeordnet. Im Hohlkörper 1 befindet sich ein zweites pulverförmiges Material 11 aus einem mineralischen Trägermaterial zwischen dem ersten Material 10 und der Auslaßöffnung 8. Die ersten und zweiten Materialien 10, 11 weisen unterschiedliche Adsorptionseigenschaften für Nukleinsäuren auf. Die Unterschiede in den Adsorptionseigenschaften werden durch unterschiedliches Adsorptionsverhalten in Puffern hoher bzw. niedriger Ionenstärke bestimmt. Werden zum Beispiel Nukleinsäuren vom ersten Material 10 unter Bedingungen niedriger Ionenstärke gebunden, so muß das zweite Material 11 in der Lage sein, Nukleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke unter Bedingungen hoher Ionenstärke die Nukleinsäure vom ersten Material 10 desorbiert und an dem zweiten Material 11 adsorbiert wird.

Vorzugsweise besteht das erste pulverförmige Material 10 aus einem Anionenaustauscher aus oberflächenchemodifizierten Trägermaterialien auf Basis von Agarose, Dextranen, Cellulose, Acrylamid, Polyvinylalkohol, Polystyrol, Glas, Aluminiumoxid, Titanoxid, Zirkonoxid oder Silicagel, insbesondere Anionenaustauscher der oben genannten Art auf Silicagelbasis. Der vorzugsweise basische Ionenaustauscher weist eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, bevorzugt von 10 bis 40 µm, insbesondere 15 bis 25 µm, und einem Porendurchmesser von 1 bis 2.500 nm, vorzugsweise 10 bis 500 nm, insbesondere 200 bis 400 nm, auf.

Das zweite Material 11 ist ein mineralisches Trägermaterial, insbesondere aus Silicagel, Glas, Zeolith, Aluminiumoxid, Titandioxid, Zirkonoxid, Kaolin, Kieselsäure, vorzugsweise ein Silicagel, gegebenenfalls in Form einer Silicagelsuspension. Das zweite Material 11 weist vorzugsweise eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, insbesondere 1 bis 30 µm, bevorzugt 1 bis 5 µm, auf.

Die Einrichtungen 5 und 6 bestehen vorzugsweise aus gesintertem Glas (Fritten) oder Membranen aus Kunststoff, wie Polyethylen, PTFE, Polypropylen, Glas, Keramik, Nylon oder ein Vlies aus Polypropylen, Poylithylen. Nylon. Die Porosität der Einrichtungen 5, 6 be-

Nach dem Trocknen der Filter erfolgt dann die Elution in üblicher Weise mit einer verdünnten wässrigen Salzlösung, wie z. B. in Anal. Biochem. 101, 339 - 341 (1980) beschrieben. Ein bevorzugtes Elutionsmittel ist 0,5 bis 2 mM Tris-HCl, pH 7 bis 8, enthaltend 0,05 bis 0,2 mM EDTA, im folgenden als TE bezeichnet. Besonders bevorzugt wird ein pH-Wert von 7,5 bis 8,5. Ein anderes geeignetes Elutionsmittel sind verdünnte Detergenslösungen, wie zum Beispiel 0,1% SDS, die jedoch weniger bevorzugt werden.

Es hat sich gezeigt, daß außer Silicagel auch andere mineralische Träger zur Adsorption der Nukleinsäuren geeignet sind, in einer bevorzugten Form wird jedoch Silicagel der Partikelgröße 1 bis 250 µm, bevorzugt 1 bis 50 µm, insbesondere 1 - 5 µm, eingesetzt. Die Entsalzungsschicht kann als eine feste geschüttelte Schicht, die zwischen zwei FE-Fritten eingeschlossen ist, in der Extraktionsssäule eingesetzt werden. Eine andere Ausführungsform beinhaltet die Anwendung der mineralischen Träger in Membranform nach EP 0 323 055 (07.12.1988, 3M, Composition Chromatographic Article).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäuren verschiedener Provenienz getrennt und präpariert werden. Dabei ist es gleichgültig, ob die Nukleinsäuren aus Bakterien, Zellkulturen, Blut Gewebe, Urin, Viren oder aus Amplifikationsreaktionen, wie PCR (Polymerase Chain Reaction), SSSR (Self-Sustained Sequence Replication), Ligase-Chain-Reaction und ähnlichen Reaktionen stammen, oder ob es sich um markierte Nukleinsäuren, wie in Biotin markierte, fluoreszenzmarkierte oder radikalaktiv markierte Nukleinsäuren handelt. Als Nukleinsäure kommen Nukleinsäuren in einem Größenbereich von 10 Nukleotiden bis 200.000 Nukleotiden in Betracht. Als Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung werden Oligonukleotide von 10 bis 100 Nukleotiden, RNA mit 50 bis 25.000 Nukleotiden, Plasmid-DNA mit 2.500 bis 25.000 Basenpaaren, Cosmid-DNA mit 5.000 bis 60.000 Basenpaaren oder genomische DNA mit 100 bis 200.000 Basenpaaren verstanden.

Die nach Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltene Nukleinsäurefraktion oder -fraktionen werden in Lösungen mit geringer Salzbelastung erhalten. Es ist somit möglich, die für die weitere Prozessierung erforderlichen Pufferbedingungen nachträglich einzustellen. In besonders vorteilhafter Weise wird die an dem Silicagel gebundene Nukleinsäure bereits in dem zur Weiterverarbeitung bestimmten Puffer eluiert. Die isolierten Nukleinsäuren werden für die unterschiedlichsten Anwendungen eingesetzt. Besonders häufig erfolgt die enzymatische Umsetzung mit Restriktionsenzymen. Polymeasen und Ligasen zur Restriktionsanalyse, Sequenzierung, Markierung mit Radioaktivität oder nicht radioaktiven Markern, wie Biotin, FITC, Digoxigenin und der Amplifikation mit Hilfe der PCR, SSSR (Self-Sustained-Sequence Replication) und Ligase-Chain-Reaction

12 mal aneinanderengesetzt hergestellt werden, wobei 96 Proben prozessierbar werden. Der große Vorteil ist dann gegeben, wenn das international standardisierte Mikrotiter-Format verwendet wird.

Die Figur 7 beschreibt eine Vorrichtung, die in einem zylindrischen Hohlkörper 1 mit Einlaßöffnung 7 und Auslaßöffnung 8 ein Anionenaustauschermaterial 10 zwischen zwei Einrichtungen 6 und 5 fixiert enthält. Darauf ist aufgesteckt ein weiterer zylindrischer Hohlkörper in dessen Lumen verschiedene Filterschichten angeordnet sind. Die Filterschichten 20, 21, 22 können aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, PTFE, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschüttelten Diatomeenschwebes, verklebtes Vlies in Form von Polypropylen, Polyester, Glaskäsern und Silica kommen in Betracht. Die Porosität der einzelnen Schichten beträgt vorzugsweise 15 µm bis 500 µm in einer Dicke von 0,1 mm bis 10 mm. Die Porengröße der Filterschicht wird, in Fließrichtung gesehen, von Schicht zu Schicht geringer, in einer typischen Ausströmungsform beträgt die Größe der Poren in der Schicht 20 etwa 100 bis 300 µm, in der Schicht 21 30 bis 100 µm und in der dritten Filterschicht 5 bis 30 µm.

Die Figur 8 zeigt eine weitere bevorzugte Ausströmungsform der Vorrichtung nach Figur 7, wobei als, in Fließrichtung gesehen, oberste Filterschicht 23 eine hydrophobe Schicht eingesetzt wird. Die hydrophobe Trennschicht 23 verhindert die unerwünschte Penetration des rohen Zell-Lysats in die Filterschicht vor Beginn der eigentlichen Filtration. Die hydrophobe Trennschicht 23 besteht vorzugsweise aus versponnenem oder gesintertem Polypropylen, Polyethylen, Polyester oder Polytetrafluorethylen (PTFE)-Fasern, in einer Porosität von 10 µm bis 500 µm und vorzugsweise eine Dicke von 0,1 bis 5 mm.

Die Figur 9 beschreibt eine Filtrationsvorrichtung, die ähnlich aufgebaut ist, wie die in den Figuren 7 und 8 beschriebenen, mit dem Unterschied, daß verschiedene Filterschichten mit abnehmender Porengröße in einer einzigen Filterschicht 12 mit kontinuierlich abnehmender Porengröße verbunden sind. Die asymmetrische Filterschicht 12 ist vorzugsweise mit einer hydrophoben Filterschicht 23 am oberen Ende, in Fließrichtung gesehen, versehen. Die asymmetrische Filterschicht 12 besteht vorzugsweise aus versponnenem Polypropylen oder Polyester, kommerziell erhältlich sind Profile, beispielsweise von Pall Filtertechnik, Dreieck, Frankfort, mit Porositätsabstufungen von 500 bis 50 µm, 100 bis 10 µm, 50 bis 5 µm sowie 10 bis 0,1 µm. Die Dicke der asymmetrischen Filterschicht sollte vorzugsweise 1 mm bis 10 mm betragen.

Die Figur 10 beschreibt Filtrationseinrichtungen zur Abtrennung von Nukleinsäuren im erfindungsgemäßen Sinne wobei auf die Filterkontingenzen der Figur 9 zurückgegriffen wird und wobei eine asymmetrische Filterschicht mit einer hydrophoben Filterschicht 23 versehen ist. Im Hohlkörper 1 befindet sich anstelle des Anionenaustauschers 10 ein mineralischer Träger 11, der in der

Tragt vorzugsweise 10 bis 500 µm.

Eine weitere bevorzugte Ausströmungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung zeigt die Figur 2. Dort ist das erste Material 10 und das zweite Material 11 so im Hohlkörper 1 angeordnet, daß die Materialien 10, 11 direkt aneinanderengrenzen und zwar in getrennten Schichten, die gemeinsam von den Fixiereinrichtungen 5, 6 gehalten werden. Vorzugsweise kann das Material durch eine Trenneinrichtung 13 getrennt werden, wobei die Trenneinrichtung 13 eine poröse Scheibe, vorzugsweise aus gesintertem Glas, oder eine Kunststoffmembran, oder Gewebe, vorzugsweise aus Nylon, ist.

Die Figur 3 zeigt eine weitere bevorzugte Ausströmungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei das zweite Material 11 in dem einen Kanal bildenden Auslaß 18 zwischen den Fixiereinrichtungen 5, 15 fixiert ist. Die einen Kanal bildende Auslaßöffnung 18 weist einen geringeren Querschnitt als der Hohlkörper 1 auf und mündet vorzugsweise in einem Kanal 18a, dessen Querschnitt geringer als derjenige des Kanals 18 ist. Das erste Material 10 befindet sich im Lumen des Hohlkörpers 1 im Bereich des größeren Durchmessers und ist durch die Einrichtung 6, 16 fixiert. Es kann dabei vorteilhaft sein, das erste und zweite Material 10, 11 aneinanderengrenzen zu lassen, so daß diese nur durch eine gemeinsame Einrichtung 17 getrennt sind (siehe Figur 4).

Die Figur 5 beschreibt eine weitere bevorzugte Ausströmungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die im Hohlkörper neben den Schichten aus einem ersten und zweiten Material 10, 11 eine weitere Schicht 12 aufweist, die über dem ersten Material 10 angeordnet ist. Die Schicht 12 ist als mechanische Filtereinrichtung ausgebildet. Vorzugsweise ist die dritte Schicht 12 ein asymmetrischer Filter, wobei die Porengröße des Filters in Fließrichtung der Probe, also von Zuführungsoffnung 7 zur Auslaßöffnung 8 bzw. 18, abnimmt. Damit können auch noch in der Probe befindliche Zellklümmern entfernt werden, ohne daß die Gefahr einer Verstopfung der Vorrichtung besteht.

Die Materialien 10 und 11 können in sämtlichen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung entweder pulverförmig und/oder als Preßkörper ausgebildet sein. Wenn die Materialien 10, 11 in Partikelform vorliegen, kann es empfehlenswert sein, diese in einem Trägernetz aus inerten Kunststoffen einzubetten, so daß die Schichten in Form einer Membran vorliegen-gemäß US-PS 4,810,381 und US-PS 4,699,717 sowie in der DE 41 27 276 vorgeschlagen. Das Trägernetz kann aus Teflon bestehen.

Die Figur 6 beschreibt eine weitere bevorzugte Ausströmungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei acht einzelne, getrennte Vorrichtungen gemäß Figur 2 aneinanderengrenzen und eine Achtereinheit bilden. Der Vorteil dieser Ausströmungsform, die mit jeder der in 1-5 beschriebenen Einzelformen durchführbar ist, liegt in der parallelen Präparation von 8 Proben - unter Zuhilfenahme von Mehrkanalpipetten. Diese Form kann auch

Lage ist, Nukleinsäuren in hochkonzentrierten Salzlösungen zu adsorbieren.

Die Figur 11 beschreibt eine Konfiguration in einer Verbindung der Figuren 9 und 10. Dabei wird der Vor-

richtung, die in Figur 2 beschrieben wird, lediglich ein Filteraufsatz bestehend aus einem asymmetrischen Fil-

ter 12 und einer hydrophoben Filterschicht 23 zugeord-

net etwa durch Einstechen einer entsprechenden ausge-

bildeten Kartusche:

Sämtliche Einzelvorrichtungen, die in den Figuren 1 bis 5 und 7 bis 11 näher beschrieben worden sind,

lassen sich in einem Mikrotiterstreifen bestehend aus 8

aneinandergesetzten Einzelvorrichtungen anordnen. Beispielhaft ist dies noch einmal in den Figuren 12 bis 14 dargestellt.

Die Figur 12 zeigt eine Filtrationsvorrichtung mit An-

ionen austauscher, wobei ein Mikrotiterstrip oder eine

Mikrotiterplatte mit 8 bzw. 8 x 12 Vertiefungen gezeigt

wird. In der Vorrichtung gemäß Abbildung 12 befindet

sich eine asymmetrische Filtrationsvorrichtung in einer

aufsteckbaren Kartusche auf dem zylindrischen Hohl-

körper 1, der eine Anionenaustauscherschicht zw-

ischen den Einrichtungen 5, 6 fixiert enthält.

Die Figur 13 betrifft eine Filtrationsvorrichtung, die

anstelle des Anionenaustauschermaterials ein minera-

lisches Trägermaterial besitzt, welches in der Lage ist,

Nukleinsäuren in hohen Salzkonzentrationen zu adsor-

bieren. Vorzugsweise befindet sich eine Silicagelschicht

11 angeordnet zwischen zwei Einrichtungen 5 und 6.

Die Figur 14 zeigt eine Kombination der Anordnung

gemäß Figur 2 sowie einer asymmetrischen Filter-

schicht mit hydrophober Filterschicht, die über dem

Hohlkörper 1 in Fließrichtung der Probe gesehen, an-

geordnet ist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, insbesondere

aus dem zweiten Material 11 mit nur sehr geringen Flüssigkeitsmengen gewährleistet ist.

Der Durchfluß der Probe durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird grundsätzlich durch die Schwer-

kräfte bewirkt, jedoch kann zur Beschleunigung der Re-

nigung und Trennung der Nukleinsäuren ein Überdruck

an der Öffnung 7 bzw. ein Unterdruck an der Öffnung 8

bzw. 18 angelegt werden. Eine weitere bevorzugte Aus-

führungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ver-

wendet als asymmetrische Filter solche aus gesinter-

tem Glas mit abnehmender Porengröße oder überein-

andergeschichtete Kunststoffmembranen mit abneh-

mender Porengröße in Fließrichtung der Probe durch

den Hohlkörper.

Nukleinsäuren aus Zellen und anderen Quellen können ohne Zentrifugation, Phenol/Chloroform-Ex-

traktion und ohne Alkoholfällung erhalten werden, wo-

bei die Nukleinsäure am Ende des Verfahrens in kon-

zentrierter Form in Wasser oder Puffer niedriger Salz-

konzentration vorliegt und somit direkt für anschließende

enzymatische Reaktionen einsetzbar ist. Ein weite-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

7

Der Vorteil besteht darin, daß der Einsatz von teuren Laboreinrichtungen vermieden werden kann. Die Elution kann beispielsweise durch Schwerkraft bewirkt werden und muß nicht mittels sogenannter HPLC-Geräte durchgeführt werden.

Die Herstellung einer Silicagel-Anionenaustauscher/Silicagel-Extraktions-Säule erfolgt vorzugsweise dadurch, daß ein Polypolypropylen-Gefäß passend in ein handelsübliches 1,5 ml Zentrifugen-Gefäß, unten mit einer 50 µm Polylethylen-Fritte (poröse Filterschicht aus Polylethylen, 1,5 mm dick) verschlossen und mit 50 mg Silicagel (Lichrosphere Si 100, 16 - 24 µm; Merck, Darmstadt, FRG) überschichtet wird. Diese Silicagelschicht wird mit einer zweiten porösen Polylethylen-Frit-

te verschlossen und die zweite Fritte mit 100 mg Silicagel-Anionenaustauscher (Ciagen, Fa. Diagen, Düsseldorf, FRG), Partikelgröße 16 bis 23 µm überschichtet und abschließend mit einer dritten porösen Polylethylen-Fritte verschlossen.

Die Herstellung einer Anionenaustauscher-Membran/Silicagel-Membran-Extraktions-Säule nach Figur 3 erfolgt vorzugsweise dadurch, daß in ein Polypolypropylen-Gefäß auf eine Polylethylen-Fritte eine 1 mm dicke Empore/Silicagelmembrane (3) (3M Corp. St. Paul, MN, USA), ein 0,2 mm dickes Polypolypropylen-Vlies und 1 mm dicke Anionenaustauscher-Membrane bestehend aus 16 bis 23 µm Ciagen Anionenaustauscher Partikel (Diagen GmbH, Düsseldorf, FRG) platziert wird.

Die Herstellung einer Anionenaustauscher/Silicagel-Mikrotiterstreifen-Extraktions-Säule erfolgt wie beschreiben. Ein Mikrotiterstreifen mit 8 oder 96 Positionen wird mit einer DEAE-Silicagel-Membran und einer Silicagel-Membran gefüllt. In eine Bohrung eines Mikrotiterstreifens werden eine 0,75 mm dicke Silicagelmembran, hergestellt aus Sident 9 Silicagelpartikeln (Fa. Degussa, Frankfurt, FRG), eine 0,2 mm dicke Polypolypropylen-Vlies-Schicht und eine 0,8 mm dicke Anionenaustauscher-Membran hergestellt aus Ciagen, 16 - 23 µm (Fa. Diagen, Düsseldorf, FRG) eingepaßt.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele weiter erläutert.



Exemple 1

## Präparation von Plasmid DNA

Eine 100 ml Kultur in LB-Ampicillin Medium mit pUC

18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase

Um die Zelle zu lysieren, werden 10 ml 0,2 M Na-

OH, 1% SDS zur Zelluspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen

gelassen. Danach wird mit 10 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure neutralisiert, gemischt und 15 Minuten auf Eis

inkubiert. Das Lysat wird 30 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgehoben. 1 ml

klares Zell-Lysat wird auf eine DEAE-Anionenaustauscher/Silicagel-Zentrifugations-Extraktions-Säule

pettiet und die Probe durch die Austauscherschicht 1 Minute bei 2.500 g zentrifugiert. Die Extraktionssäule

wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0

0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub> gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Etha-

hol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssau-

ie wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser

gewaschen. Spuren an EtOH werden eventuell durch eine weitere Zentrifugation entfernt. Anschließend wird

die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 3,0 durch Zentrifugieren eluiert und in neuen 1,5 ml Rör-

chen aufzufangen. Die eluierte DNA kann dann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Re-

## Beispiel 2

## Parallele Präparation von Plasmid DNA

8 DEAE-Silicagel-Membran/Silicagel-Extraktions-

Säulen werden auf einer Vakuumkammer aufgesetzt. 8 x je 1 ml eines Plasmid DNA enthaltenden Zell-Lysates

werden unter Vakuum (20 bis 750 mbar) durch die Extraktionsssäulen gesaugt. Die Extraktionsssäule wird mit

0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml

1 M NaClO<sub>4</sub> gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10

mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht

gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und

mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die Probenöhrchen werden zur Entfernung der hochkonzentrierten

trierten Salzlösung mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM Na-Cl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und 0,8 ml 90% Ethanol/



Dabei wird die Probe nach bekannter Weise mit Proteinase, Detergentien und/oder Temperatur oder Alkali lysiert. Dieses rohe Lysat wird direkt auf den Filtrationsaufsatz dekantiert, überführt oder pipettiert. Die Filterschicht des Filtrationsaufsatzes ist so aufgebaut, daß ein Verstopfen der Filter durch die Zelltrümmer, ausgefallene Proteine oder Detergentien vermieden wird. Das Zell-Lysat wird durch die Filterschicht mit einem Stempel oder Überdruck durchgedrückt oder unter Anlegen eines Vakuums durchgesaugt. Dabei werden alle ungelösten Bestandteile zurückgehalten und das klare Lysat tropft direkt auf die Adsorptionsschicht. Durch die Wahl der geeigneten Adsorptionsbedingungen wird die Nukleinsäure an der Adsorptionsschicht adsorbiert. Die Filtrationseinheit mit dem Filterkuchen wird von der Adsorptionseinheit abgetrennt, verworfen oder für die Analyse des Filterkuchens aufgehoben. Die Adsorptionseinheit wird mit geeigneten Lösungsmitteln oder Puffern nachgewaschen, um unerwünschte Bestandteile zu entfernen und die erwünschte Probe wird zum Schluß mit einem geeigneten Elutionsmittel eluiert. Beispielsweise läßt sich nach dem erfindungsge- mäßigen Verfahren Plasmid DNA ohne eine Klar-Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge präparieren, 96 x 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL1 Blue E.coli Zellen, werden im 2 x YT Medium 18 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Verteilungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2.500 g pelletiert. Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A in die Mikrotitervertiefungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einem Vibrations-Schüttler resuspendiert. Die resuspendierten Zellen werden in das Probenreservoir des Filtrationsaufsatzes überführt und mit 0,25 ml 0,2 M NaOH/1% SDS versetzt. Die Probe wird 5 Minuten auf einem Vibrations-Schüttler geschüttelt oder mit einem Stopfen oder einer Kiebelrolle verschlossen und gemischt, oder durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur zur Lyse wird zur Neutralisation der NaOH und Präzipitation des SDS 0,25 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure zugegeben und nach einem der oben beschriebenen Verfahren gemischt. Dieses rohe Zell-Lysat wird nun statt einer Zentrifugation auf einer Vakuumkammer bei 10 mbar - 800 mbar Vakuum durch die Filtrationsschicht gesaugt. Eine asymmetrische oder eine stufenweise Porosität im Bereich 200 µm bis 5 µm aufweisende Filterschicht mit einer Dicke von 2 - 10 mm hält die Zellbruchstücke und anderen ungelösten bzw. präzipitierten Bestandteile zurück ohne zu verstopfen. Das Plasmid DNA enthalten- de, klare Zell-Lysat tropft durch die Filterschicht auf die Adsorptionsschicht (Anionenaustauscher oder Silica- gel) und die DNA wird adsorbiert, wogegen Proteine, RNA und andere zelluläre Metabolite unter den gegebenen Salzbedingungen nicht binden. Die Filtration ist

Präparation, Entsalzung und Konzentration von DNA im Mikrotiterformat

#### Beispiel 5

96 x 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL 1 Blue E.coli Zellen, werden im 2 x YT Medium 18 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Verteilungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2.500 g pelletiert. Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A in die Mikrotiterplattenvertiefungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einen Vibrations-Schüttler resuspendiert.

Die Zellen werden durch die Zugabe von je 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS 5 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln lysiert. Anschließend werden 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure, pH 5,5 - 6,0 - je 0,25 ml zugegeben, die einzelnen Nüple Neutralisationspuffer zugesogen und gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Minute auf Eis wird die Probe 30 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellbruchstücke und das präzipitierte SDS zu pelletieren. Der Überstand wird mit einer 8-Kanal-Multichannel-Pipette vorsichtig abgehoben und in die 96er Mikrotiterplatte mit einer DEAE-Silicagelmembrane und Silicagelmembrane pipettiert. Nach der Überführung aller 96 Proben werden die Proben durch Anlegen eines Vakuums an eine Filtrationsapparat durch die Mikrotiterplatte gesaugt. Die DNA wird dabei an die Anionenaustauscher-Schicht adsorbiert, wogegen unter diesen speziellen Bedingungen Proteine, RNA und Metabolite nicht adsorbiert werden.

Die Extraktionsssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionsssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Anschließend wird die von Salz befreite DNA in konzentrierter Form mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 von der Silicagel-Schicht in eine weitere Mikrotiterplatte eluiert.

Die Herstellung der Zell-Lysate mit Hilfe der Zentrifugation ist ein langwieriges und aufwendiges Verfahren. Die Limitierung ist vor allem dann gegeben, wenn viele Proben routinemäßig präpariert werden müssen. Die Zentrifugation hat den Nachteil, daß sie sich nicht automatisieren läßt.

Ein weiterer Gegenstand (und Verfahren) der Erfindung ist eine Vorrichtung und ein Verfahren zur automatischen Durchführung des Verfahrens ohne Zentrifugation in Form einer Filtrationseinheit, die--der eigentlichen Reinigung der Nukleinsäure vorgeschaltet ist

RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkohol-Pellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

#### Beispiel 7

Präparation von Plasmid DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 8

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pellettieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Filtrationsvorrichtung überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 8 gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkohol-Pellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

#### Beispiel 8

Präparation von Plasmid DNA an einer Silicagel-Schicht mit einer Vorrichtung nach Figur 10

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pellettieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 10 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Kiebelolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,5 ml 5,5 M Guanidinium-HCl, 0,25 M K-Acetat, pH 5,5 zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um

nach ca 10 bis 60 Sekunden beendet. Der Filteraufsatz wird abgenommen und zusammen mit dem Filterkuchen verworfen.

Die gebundene DNA wird mit 1 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl pH 7,0 und 2 mal mit 1 ml 1,5 M NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Na-Acetat, pH 6,5 gewaschen und mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 von Anionenaustauscher eluiert und nach Passieren der Trennschicht aus einem Nylonnetz oder PV-Vlies unter den hohen Salzkonzentrationen sofort an die Silicagelschicht gebunden. Dabei binden die Proteine und RNA bei 1 M - 2 M NaClO<sub>4</sub> nicht an die Silicagelschicht und werden ausgewaschen. Die Silicagelschicht wird zum Entfernen der restlichen Spuren an Proteinen mit 1 ml 7 M Guanidinium HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen. Die Hochsalzlösung an 7M NaClO<sub>4</sub> wird zweckmäßigerweise mit 1 ml 70% EtOH, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und 1 ml 90% Ethanol/Wasser oder 1 ml 90% Aceton/Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen wird die Plasmid DNA salzfrei und in konzentrierter Form mit 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5 eluiert.

Auf diese Weise läßt sich die Plasmid DNA in kürzester Zeit ohne Zentrifugation, Phenol/Chloroform-Extraktion und ohne Alkoholfällung mit einer Ausbeute von 50% bis 80% in konzentrierter Form isolieren. Bei der Verwendung einer beschriebenen Mikrofilterplattenversion lassen sich 96 Plasmid-Minipreps von 1 - 2 ml E.coli Kulturen mit einer Ausbeute von 1 - 10 µg DNA in ca. 60 Minuten präparieren von einer Person. Die bisher bekannten Verfahren benötigen dazu 6 bis 12 Stunden.

#### Beispiel 6

Plasmid Miniprep mit einer Vorrichtung nach Figur 7

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pellettieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 7 überführt. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen.

Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um

8,0 eluiert.

#### Beispiel 10

Präparation von 8 x 1 ml M13 DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 13

8 x 1 ml M13 Phagensuspension werden mit 0,5 ml

30% PEG 6000, 1,5 M NaCl versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben werden auf eine Vorrichtung nach Abb. 13 überführt und das Phagenlysat wird

nach Figur 13 gesaugt und filtriert. Das Phagenpellet wird durch das Durchsaugen von 7M Guanidin-HCl, pH 7,0 lysiert und die DNA gleichzeitig an die Silicagelschicht 11 adsorbiert. Die Extraktionssäule wird 2 mal

mit 1 ml 7 M Guanidin-HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktionssäule wird mit 1 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM

Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft

durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen

1,5 ml Röhrchen aufgefangan.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

#### Beispiel 11

Präparation von 8 x 12 Plasmid DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 14

96 mal 1,5 ml XL Blue E. coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die

Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Kiebelölle verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar

drückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationssäule mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionssäule vorhandene Ethanol-H<sub>2</sub>O-Feste werden

durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

#### Beispiel 9

Präparation von 8 x Plasmid DNA in einem Mikrotiterstreifen

8 mal 1,5 ml XL Blue E. coli Kulturen mit pUC 18

Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die

Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die

Vorrichtung nach Figur 14 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zelissuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Kiebelölle verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze

Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Über-

druck durch die Filtrationssäule gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionssäule vorhandene Ethanol-H<sub>2</sub>O-Feste werden

durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die

8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH

Schicht 10 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht 11 gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionssäule vorhandene Ethanol-H<sub>2</sub>O-Feste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 96 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion, wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

### Beispiel 12

Präparation von Plasmid-DNA ohne Konditionierung

Eine 3 ml Kultur in LB-Ampicillin-Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 µg/ml RNAse A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, se A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 1,2 M 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNA-bei 5.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten Eine 3 ml Kultur in LB-Ampicillin-Medium mit pUC

DEAE-Anionenaustauscher-Extraktionssäule pipettiert und die Probe durch die Austauscherschicht durchgesaugt. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Protein zu entfernen. Die DNA wird mit 0,7 ml 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 auf eine Extraktionssäule mit einer Glasfasermembran gesaugt. Die eluierte DNA-Lösung in 7 M NaClO<sub>4</sub> wird durch die Glasfasermembran gesaugt und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Spuren an EtOH werden eventuell durch ein Durchsaugen von Raumluft entfernt. Zum Schluß wird die DNA mit 100 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

### Beispiel 13

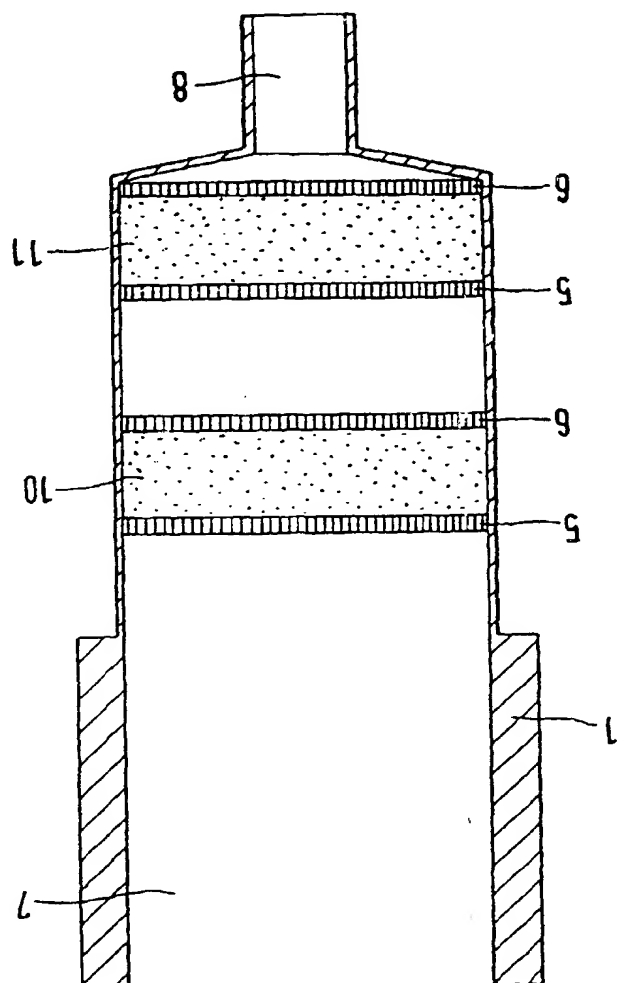
Präparation von Plasmid-DNA mit Konditionierung

Eine 3 ml Kultur in LB-Ampicillin-Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNAse A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 1,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt werden durch Filtration an einer Filterschicht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Filterschicht aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, PTFE, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde, wie Cellulose, besteht.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei die Nukleinsäure aus einer PCR- (Polymerase Chain Reaction), SSSR- (Self-Sustained-Sequence Replication), Ligase-Chain-Reaction stammt.

FIG. 1



13

55

50

45

40

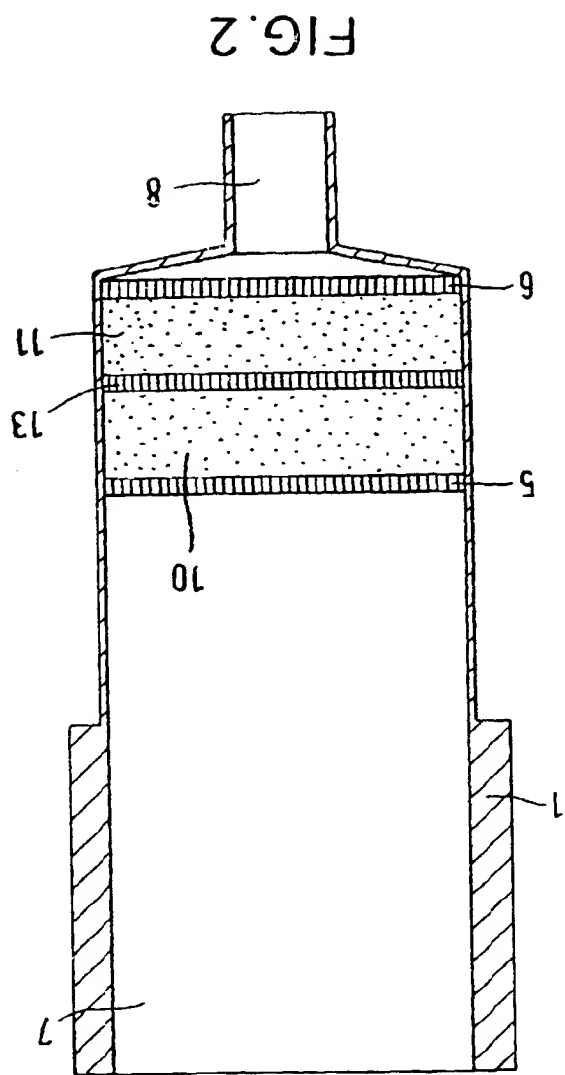
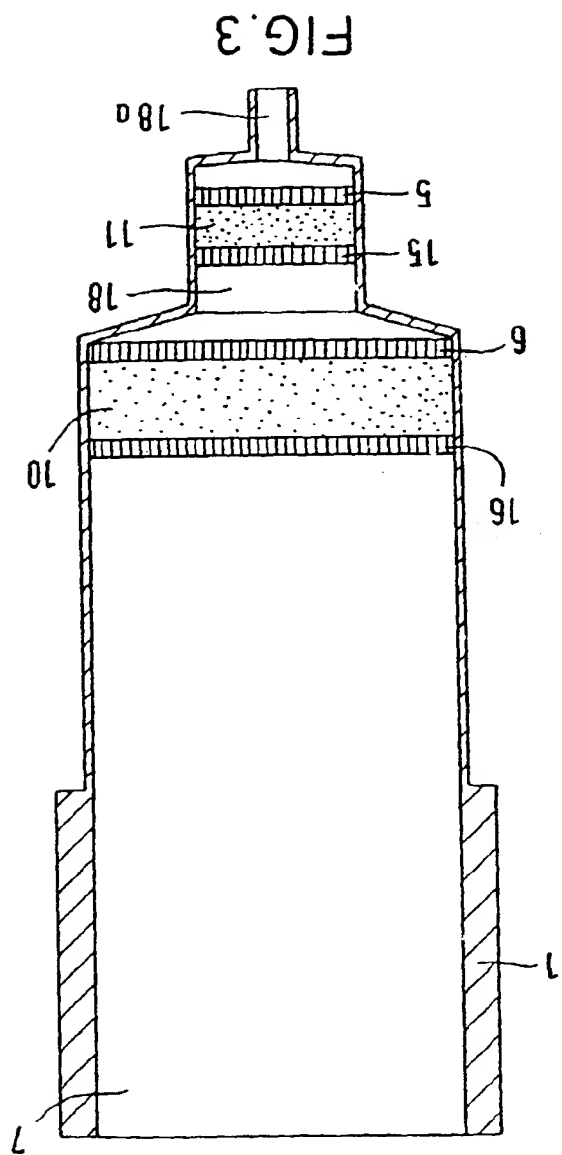
35

30

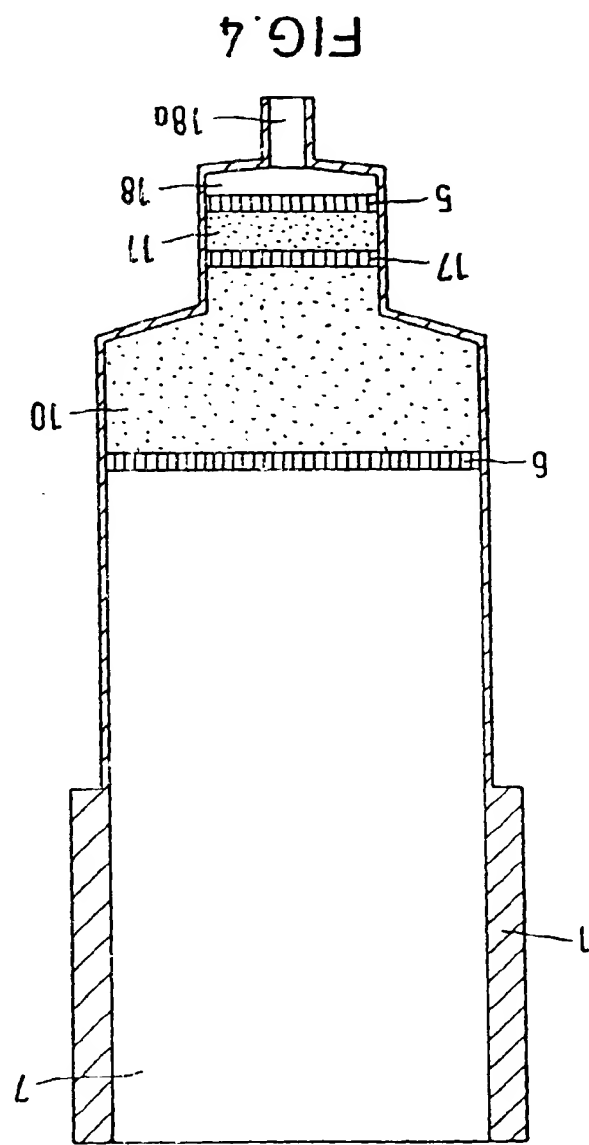
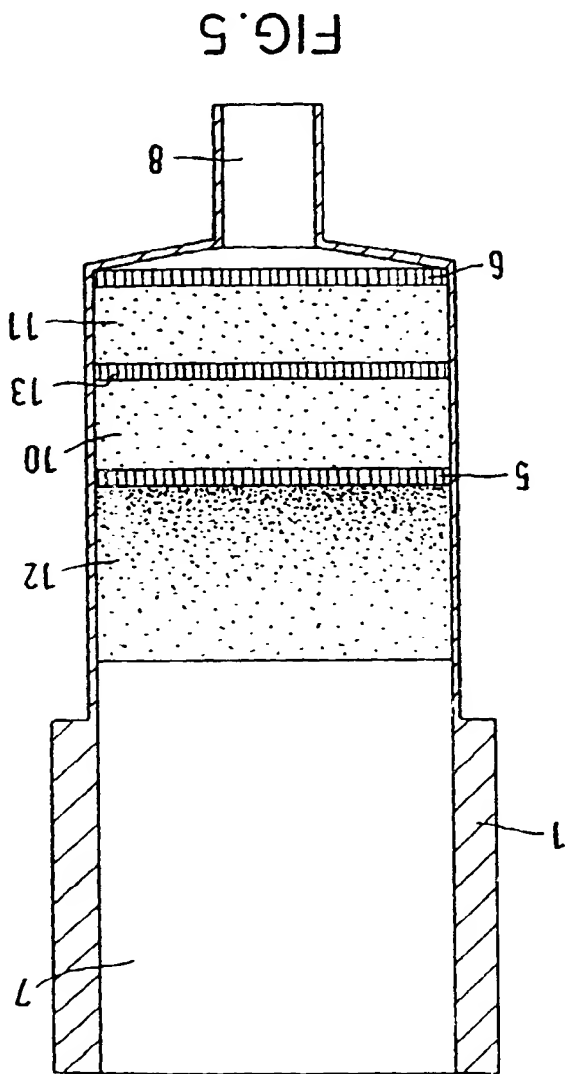
25

20

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei markierte Nukleinsäuren insbesondere mit Biotin markierte Nukleinsäuren fluoreszenz markierte Nukleinsäuren, wie mit Fluorescein-Isothiocyanat markierte oder radioaktiv markierte Nukleinsäuren eingesetzt werden.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäuren aus Bakterien, Zellkulturen, Blut, Gewebe, Urin, Viren oder anderen biologischen Quellen stammt.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Nukleinsäure 10 Nukleotide bis 200.000 Nukleotide umfaßt.







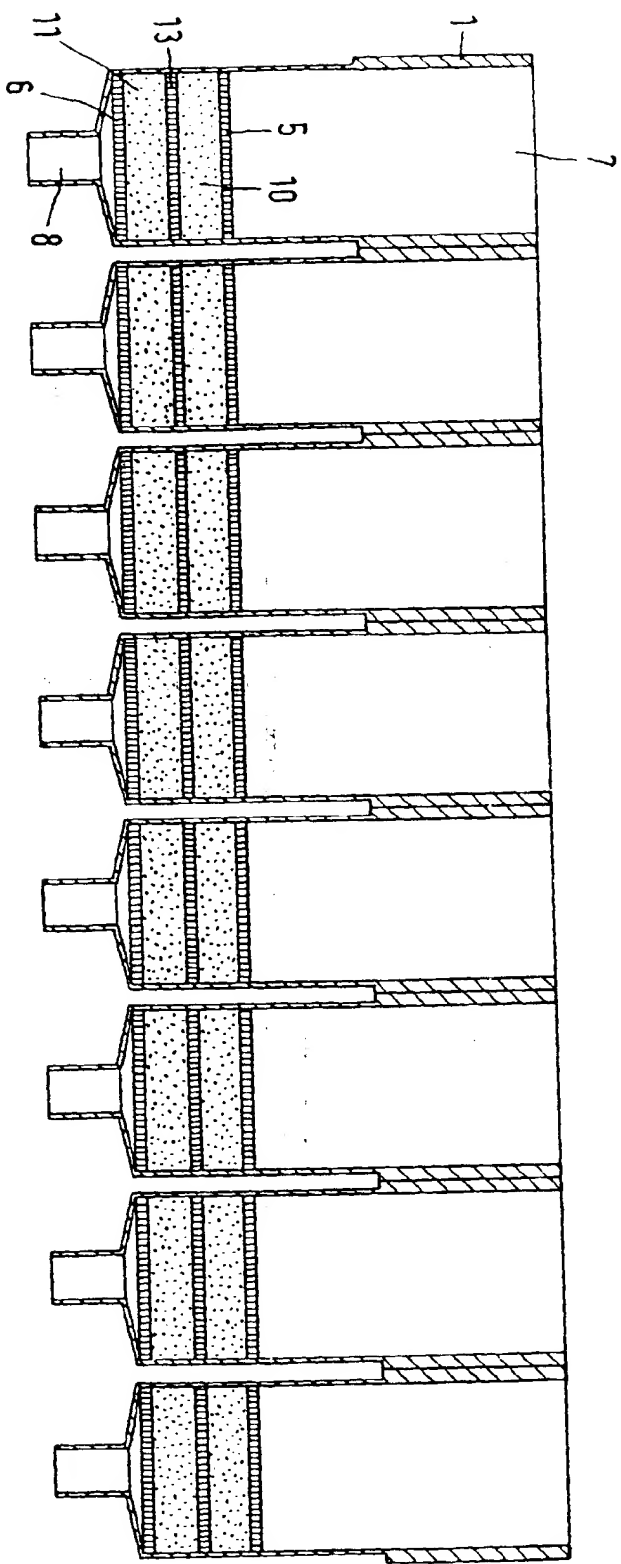


FIG. 6

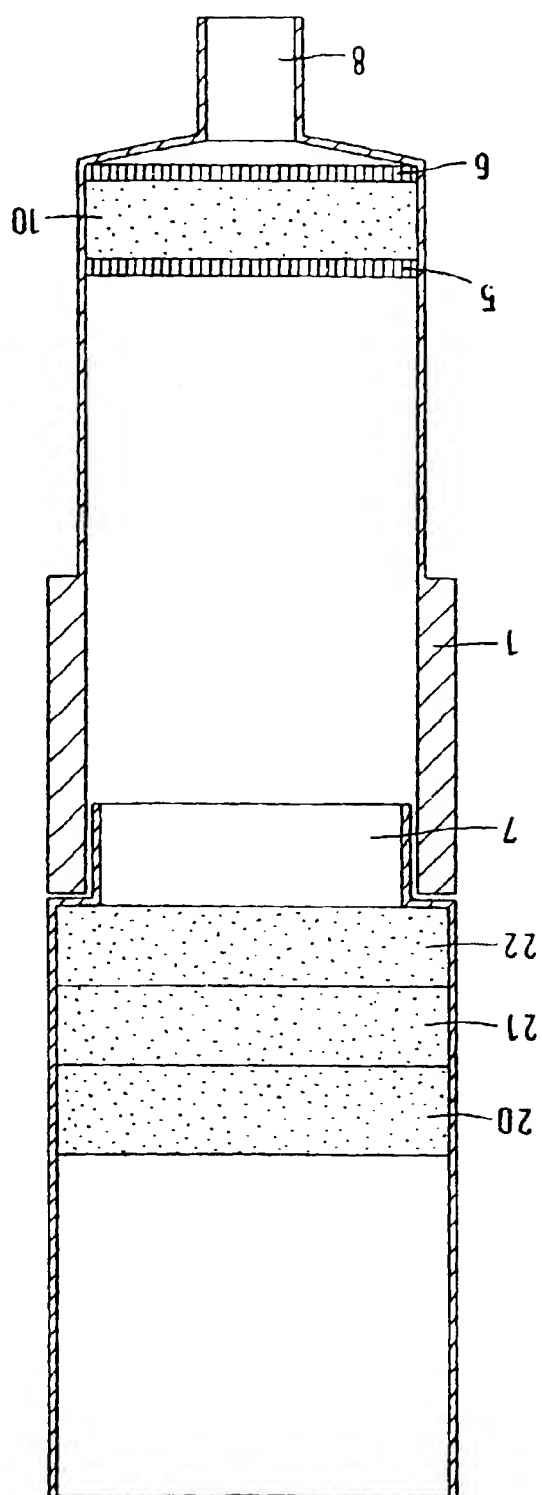
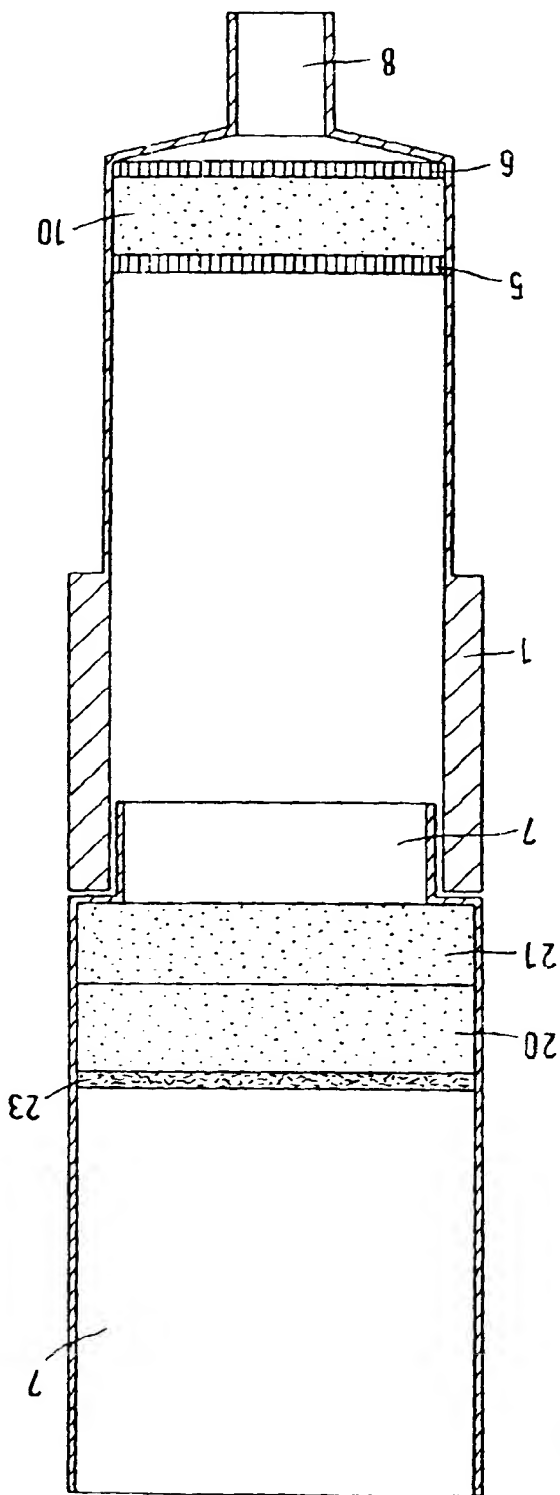


FIG. 8

FIG. 7

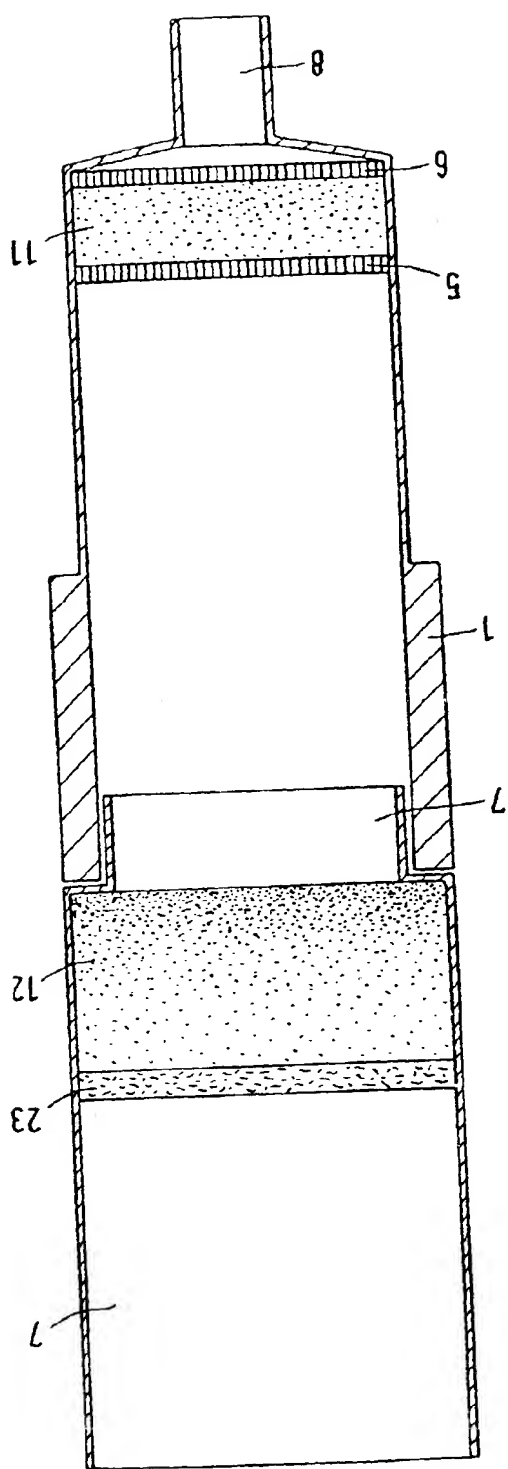


FIG. 10

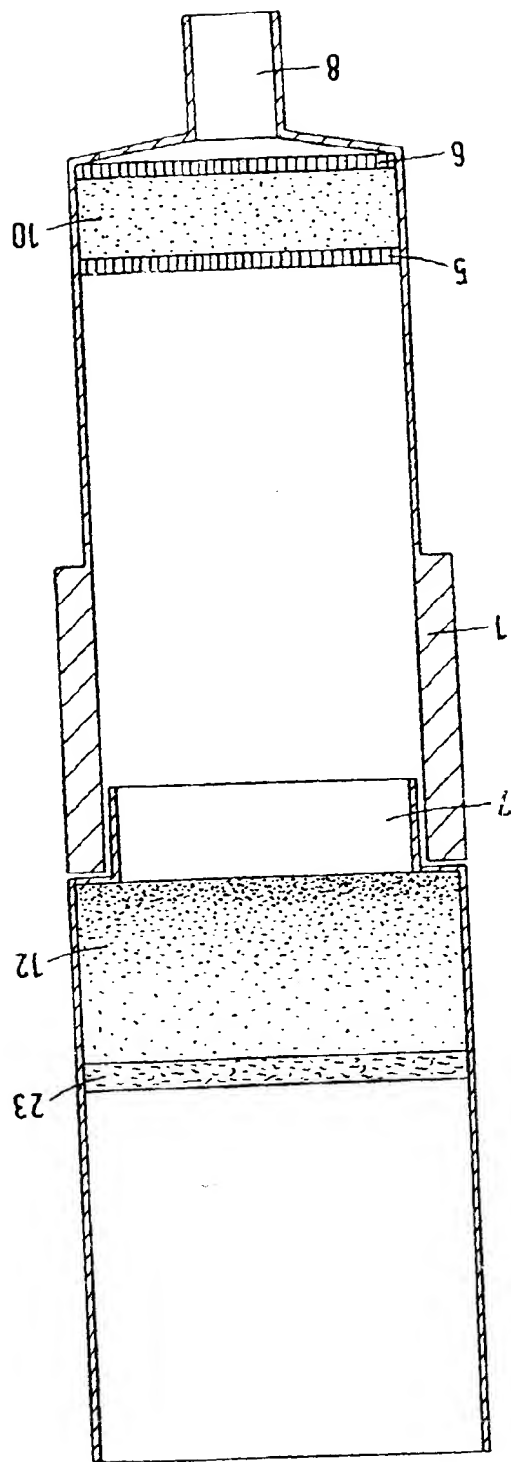


FIG. 9

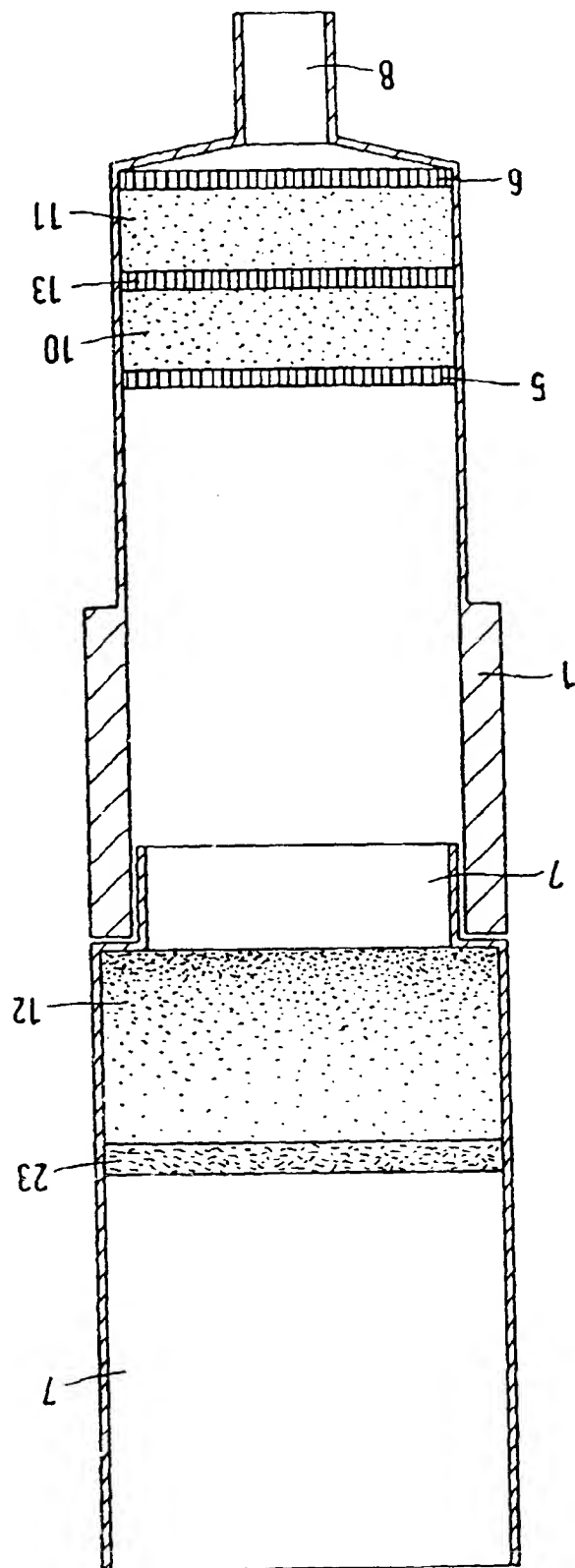


FIG. 11

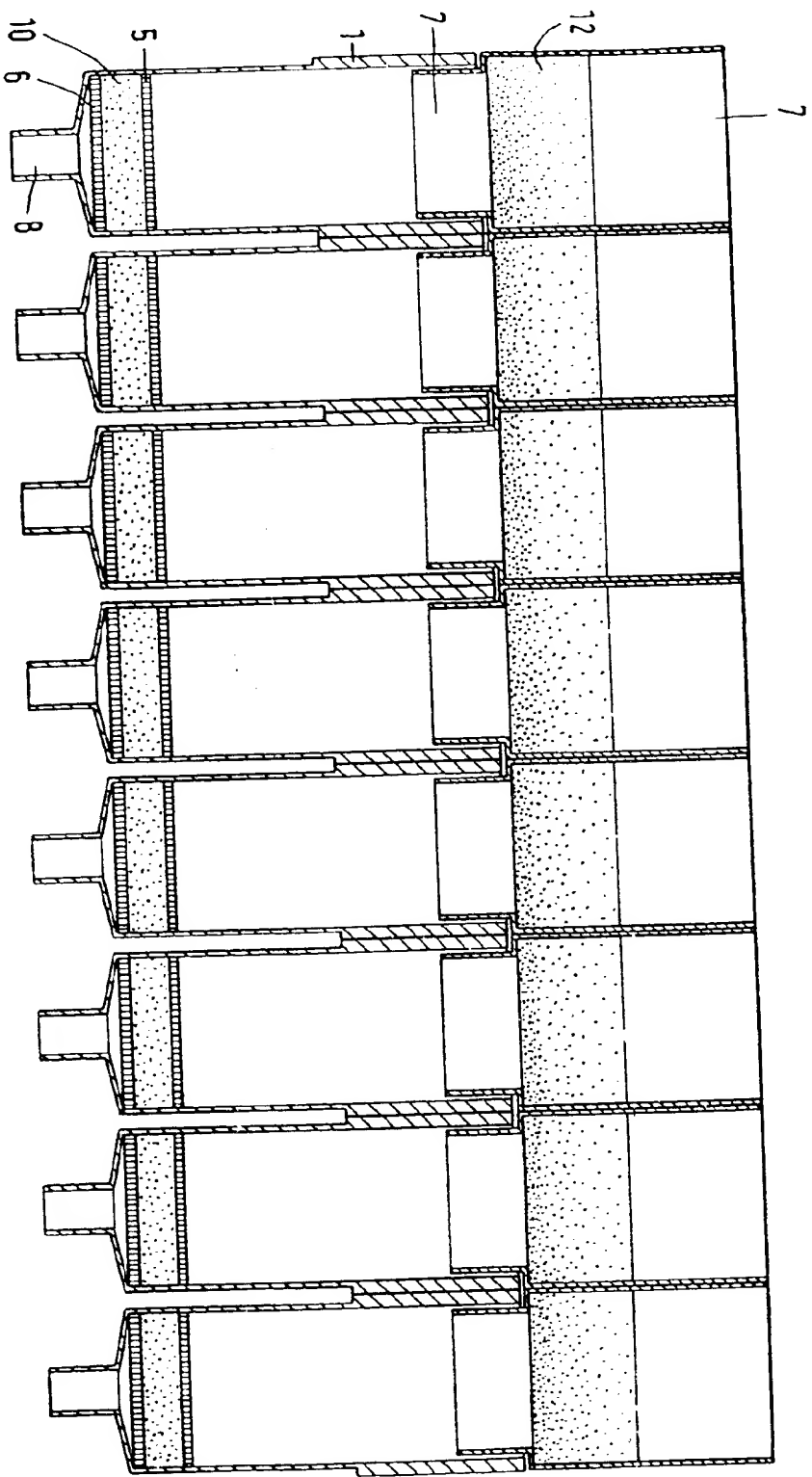


FIG. 12

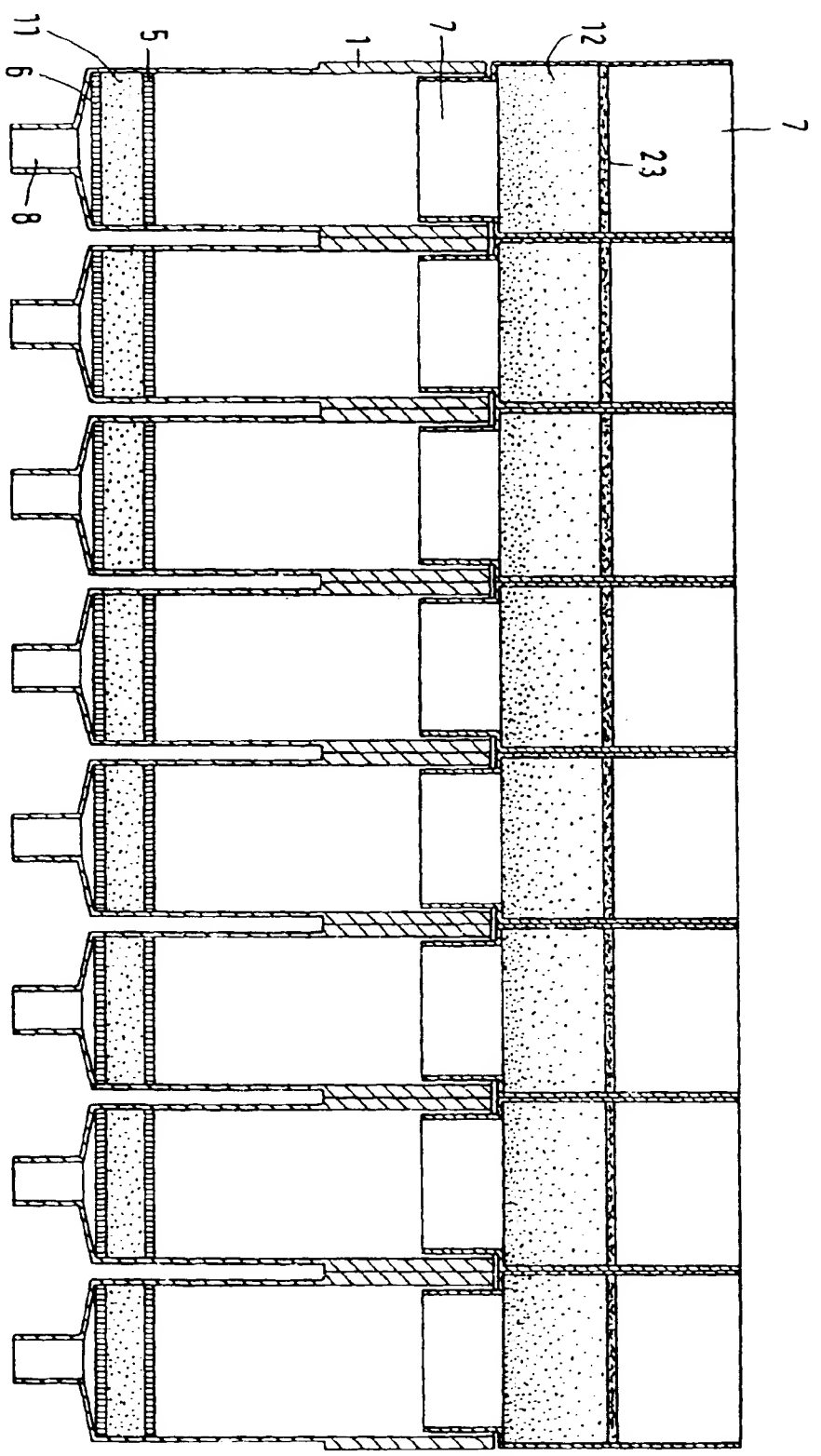


FIG.13



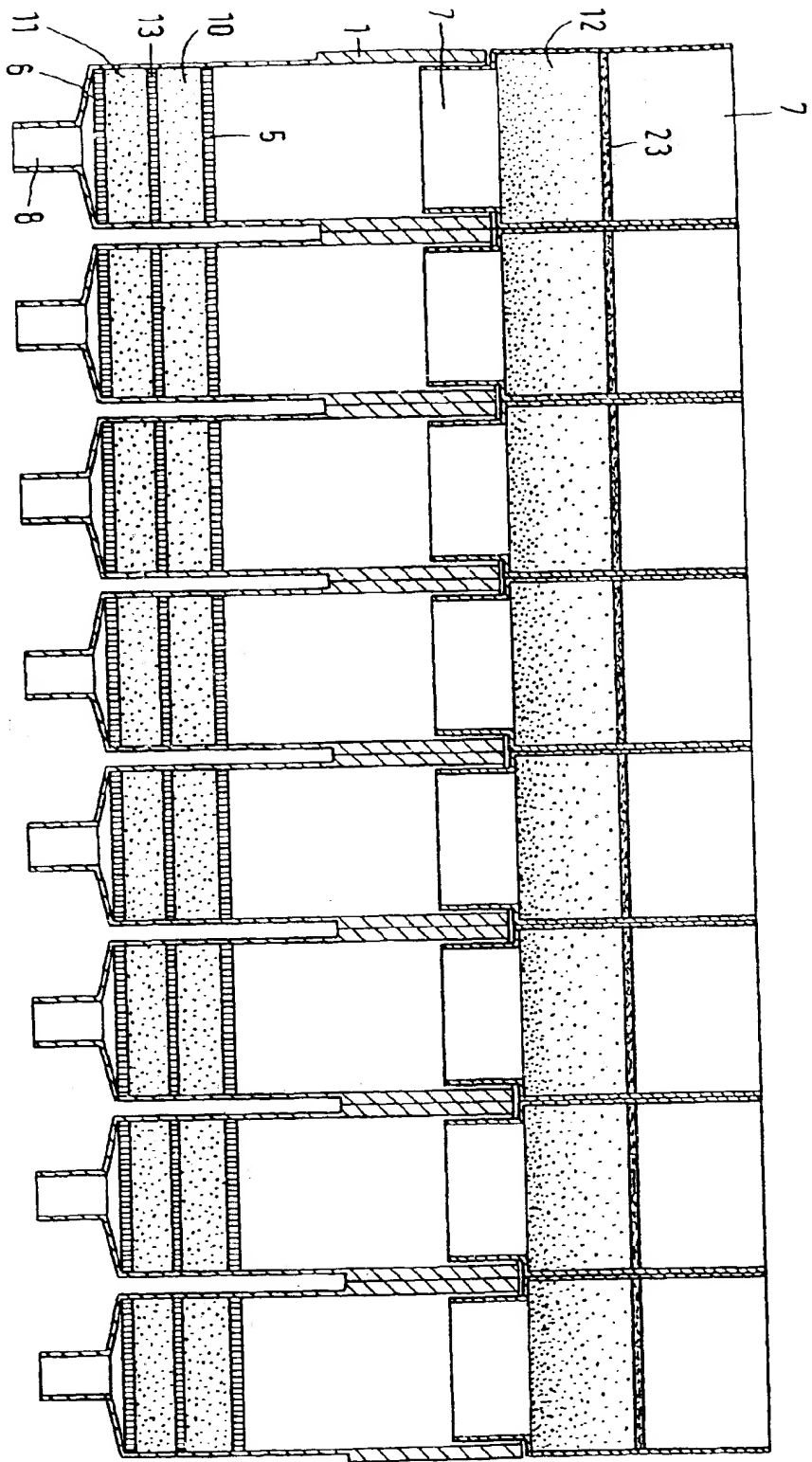
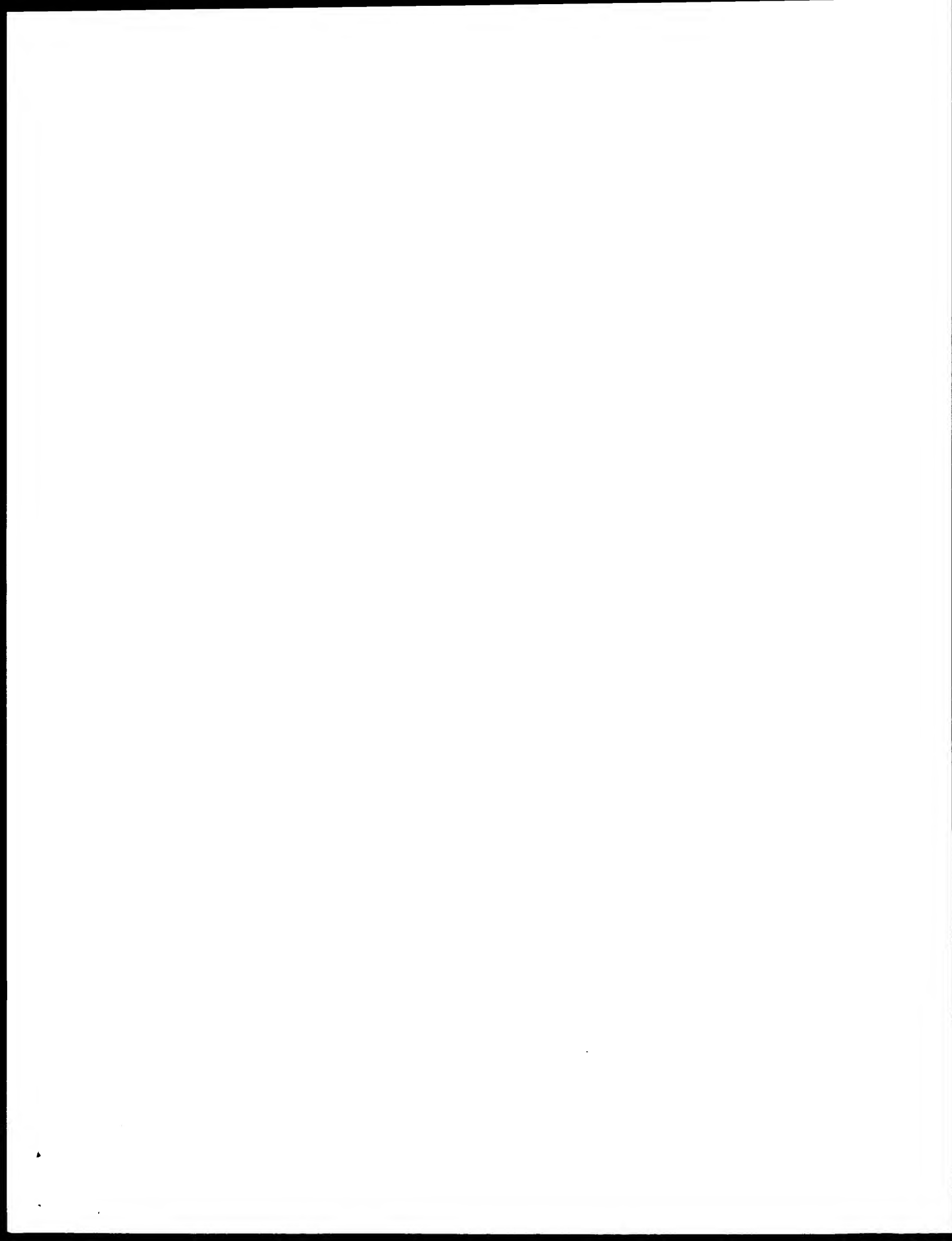


FIG. 14



EP 0 875 271 A3



(11)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(51) Int. Cl.: B01D 39/00, C12M 1/12,  
C12N 1/08, C12N 15/10,  
C12Q 1/68

(88) Veröffentlichungstag A3:  
25.04.2001 Patentblatt 2001/17

(43) Veröffentlichungstag A2:  
04.11.1998 Patentblatt 1998/45

(21) Anmeldenummer: 98107576.5

(22) Anmeldetag: 01.12.1992

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
BE CH DE DK FR GB IT LI LU NL SE

(30) Priorität: 02.12.1991 DE 4139664

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)  
nach Art. 76 EPÜ:  
92924637.9 / 0 616 639

(71) Anmelder: QIAGEN GmbH  
40724 Hilden (DE)

(72) Erfinder: Colpan, Melin, Dr.  
45219 Essen (DE)

(74) Vertreter:  
Meyers, Hans-Wilhelm, Dr.Dipl.-Chem. et al  
Patentanwälte  
von Kreisler-Setling-Werner  
Postfach 10 22 41  
50462 Köln (DE)

(54) Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

(57) Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt werden durch Filtration an einer Filterschicht.

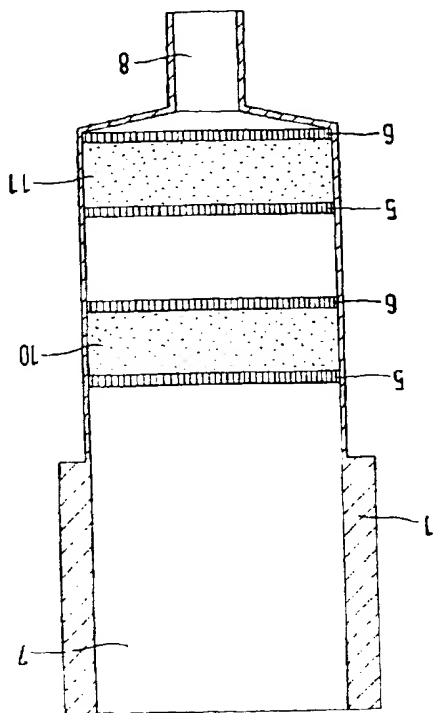


FIG. 1



(19)

Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

EP 0 875 271 A3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Bemittl. Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (InCl.7)
P, X	WO 92 00132 A (COULTER CORP.) 9. Januar 1992 (1992-1-09) * Ansprüche 1-15 *	1	B01D39/00 C12M1/12 C12N1/08 C12N15/10 C12Q1/68		
X	WO 87 07645 A (LONDON HOSPITAL MED COLL.) 17. Dezember 1987 (1987-12-17) * Anspruch 1 *	1			
A	EP 0 389 063 A (AKZO NV) 26. September 1990 (1990-09-26) * Ansprüche 1-13 *	1,2,5			
A	US 4 923 978 A (MCCORMICK RANDY M.) 8. Mai 1990 (1990-05-08) * Ansprüche 1-4 *	1-6			
A	MARKO M A ET AL.: "A PROCEDURE FOR THE LARGE-SCALE ISOLATION OF HIGHLY PURIFIED PLASMID DNA USING ALKALINE EXTRACTION AND BINDING TO GLASS POWDER" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, US, ORLANDO, FL, Bd. 121, Nr. 2, 1. April 1982 (1982-04-01), Seiten 382-387, XP000602405 ISSN: 0003-2697 * das ganze Dokument *	1-6			
A	US 5 057 426 A (HENCO KARSTEN ET AL.) 15. Oktober 1991 (1991-10-15) * das ganze Dokument *	1-6			
A	DE 37 17 209 A (DIAGEN INST MOLEKULARBIO) 1. Dezember 1988 (1988-12-01) * Ansprüche 1-4 *	1-6			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt					
Recherchenbericht		Abschlußdatum der Recherche		Priorität	
DEN HAAG		1. März 2001		Osborne, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE					
X	von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie				
Y	von besonderer Bedeutung allein betrachtet				
Z	technischer Hintergrund				
O	nichttechnische Offenbarung				
P	Zwischenliteratur				
1. der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E. älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D. in der Anmeldung angeführtes Dokument L. aus anderen Gründen angeführtes Dokument A. Mitglied der gleichen Patentfamilie, über einstimmandes Dokument					

Nummer der Anmeldung EP 98 10 7576

Europäisches Patentamt  
EUROPÄISCHER RECHTENBERICHT



EP 0 875 271 A3

# ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 98 10 7576

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

01-03-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9200132 A	09-01-1992	US 5076933 A AT 160294 T AU 654669 B AU 8215091 A CA 2084873 A DE 69128249 D DE 69128249 T EP 0536297 A JP 6507375 T US 5221483 A	31-12-1991 15-12-1997 17-11-1994 23-01-1992 30-12-1991 02-01-1998 25-06-1998 14-04-1993 25-08-1994 22-06-1993
WO 8707645 A	17-12-1987	EP 0268647 A JP 1500482 T	01-06-1988 23-02-1989
EP 0389063 A	26-09-1990	NL 8900725 A AT 156830 T AU 641641 B AU 5215390 A CA 2012777 A DE 69031237 D DE 69031237 T DE 389063 T DE 389063 T DK 389063 T EP 0819696 A ES 2085245 T GR 96300019 T GR 3025351 T JP 2289596 A JP 2680462 B JP 10072485 A KR 148693 B US 5234809 A ZA 9002190 A	16-10-1990 15-08-1997 30-09-1993 27-09-1990 23-09-1990 18-09-1997 02-01-1998 10-10-1996 30-03-1998 21-01-1998 01-06-1996 31-03-1996 27-02-1998 29-11-1990 19-11-1997 17-03-1998 01-08-1998 10-08-1993 24-12-1991
US 4923978 A	08-05-1990	AU 625639 B AU 3352589 A AU 632284 B WO 9010637 A	16-07-1992 09-10-1990 24-12-1992 20-09-1990
US 5057426 A	15-10-1991	DE 3639949 A AT 94553 T CA 1339772 A DE 3787445 D DE 3787445 T EP 0268946 A JP 7013077 B	09-06-1988 15-10-1993 24-03-1998 21-10-1993 07-07-1994 01-06-1988 15-02-1995

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang: siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 98 10 7576

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfüllen keine Gewähr.

01-03-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(ern) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5057426 A	JP 63150294 A	22-06-1988	
DE 3717209 A	01-12-1988	KEINE	

EPO FORM P041

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82